



RECEIVED

OCT 01 2001

TECH CENTER 1600/2900

PATENT  
0397-0431P

#3  
1641 MW

IN THE U.S. PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Applicant: Shinya UCHIDA et al. Conf.: Unknown  
Appl. No.: 09/915,580 Group: Unknown  
Filed: July 27, 2001 Examiner: UNKNOWN  
For: WHOLE BLOOD IMMUNOASSAY

L E T T E R

SEP 27 2001

Assistant Commissioner for Patents  
Washington, DC 20231

Sir:

Under the provisions of 35 U.S.C. § 119 and 37 C.F.R. § 1.55(a), the applicant(s) hereby claim(s) the right of priority based on the following application(s):

<u>Country</u>	<u>Application No.</u>	<u>Filed</u>
JAPAN	2000-226270	July 27, 2000

A certified copy of the above-noted application(s) is(are) attached hereto.

If necessary, the Commissioner is hereby authorized in this, concurrent, and future replies, to charge payment or credit any overpayment to Deposit Account No. 02-2448 for any additional fee required under 37 C.F.R. §§ 1.16 or 1.17; particularly, extension of time fees.

Respectfully submitted,

BIRCH, STEWART, KOLASCH & BIRCH, LLP

By MaryAnn Armbruster (10046, 064)  
Marc S. Weiner, #32,181

MSW/sh  
0397-0431P

P.O. Box 747  
Falls Church, VA 22040-0747  
(703) 205-8000

Attachment

Shinya UCHIDA et al.

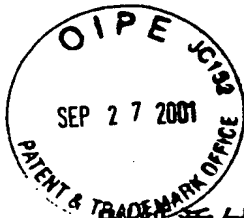
09/915,580

Filed 7/27/01

Birch, Stewart, Kolesch + Birch

(703) 205-8000

317-4314



日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日

Date of Application:

2000年 7月27日

出 願 番 号

Application Number:

特願2000-226270

出 願 人

Applicant(s):

シスメックス株式会社

TECH CENTER 1600/2900

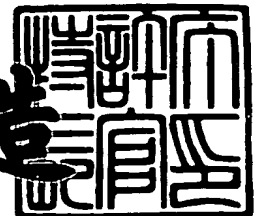
OCT 01 2001

RECEIVED

2001年 7月19日

特 許 庁 長 官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

及 川 耕 造



出証番号 出証特2001-3064792

【書類名】 特許願

【整理番号】 00-039JP

【提出日】 平成12年 7月27日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 G01N 33/53

【発明者】

    【住所又は居所】 神戸市中央区脇浜海岸通1丁目5番1号 シスメックス  
                        株式会社内

    【氏名】 内田 信也

【発明者】

    【住所又は居所】 神戸市中央区脇浜海岸通1丁目5番1号 シスメックス  
                        株式会社内

    【氏名】 小西 綾

【発明者】

    【住所又は居所】 神戸市中央区脇浜海岸通1丁目5番1号 シスメックス  
                        株式会社内

    【氏名】 鳥居 経芳

【発明者】

    【住所又は居所】 神戸市中央区脇浜海岸通1丁目5番1号 シスメックス  
                        株式会社内

    【氏名】 中嶋 一博

【特許出願人】

    【識別番号】 390014960

    【氏名又は名称】 シスメックス株式会社

【代理人】

    【識別番号】 100088867

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 西野 卓嗣

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 059617

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9723350

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 全血免疫測定方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 全血試料と、抗原（または抗体）を感作した不溶性担体粒子とを混合して免疫凝集反応を行わせ所定時間経過後、得られた凝集反応混合物を、赤血球溶解剤を含む水溶液で希釈することにより赤血球を溶解して測定用試料を調製し、測定用試料の凝集度合を検出することを特徴とする全血免疫測定方法。

【請求項 2】 赤血球溶解剤が、界面活性剤である請求項 1 記載の全血免疫測定方法。

【請求項 3】 界面活性剤が、ドデシル硫酸ナトリウムである請求項 2 記載の全血免疫測定方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、粒子凝集反応を利用した全血免疫測定法に関する。

【0002】

【従来技術】

従来、感染症関連項目の免疫検査では、測定試料に血清を使用していたが、全血から血清を得るまでには、血液凝固時間と、その後の遠心分離時間を合わせ、血清分離に少なくとも約30分の処理時間が必要となっていた。しかし、近年、免疫検査の高精度で簡易に測定できる手法が求められるようになり、特に、肝炎や HIV などの感染症患者かそうでないかを早急に判断したい緊急手術では、採血後の検査時間の短縮化を行った迅速測定法が求められていた。

【0003】

ラジオイムノアッセイ（RIA）やエンザイムイムノアッセイ（EIA）では、抗原抗体反応を行った後、B/F分離を行う必要があり、測定結果が出るまでに手間も時間がかかる。一方、粒子凝集法は、抗体（または抗原）を感作した不

溶性担体粒子（例えばラテックス）懸濁液と測定試料とを混合するだけでよく、B/F分離は必要なく、簡便な操作で実施できるという点で有利である。

【0004】

なお、検査時間の短縮化を考えた場合、測定試料に血清を用いるよりも全血を用いる方が望ましい。しかし、全血を用いた場合、血球成分の存在が粒子の凝集の度合を検出する際に妨げとなる。そこで、従来のラテックス凝集法での全血測定法として、例えば特開平10-48214号では、溶血させた後、ラテックス免疫比濁法にて検出する方法が開示されている。しかし、この方法では、溶血させるのに十分な濃度の界面活性剤は抗原抗体反応に影響を及ぼし、感度を得られないという問題があった。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、全血免疫測定法において、抗原抗体反応に影響を及ぼさずに、血球の影響を除去する方法を提供することを目的とする。

【0006】

【課題を解決するための手段】

本発明の全血免疫測定法は、全血試料と、抗原（または抗体）を感作した不溶性担体粒子とを混合して免疫凝集反応を行わせ所定時間経過後、得られた凝集反応混合物を、赤血球溶解剤を含む水溶液で希釈することにより赤血球を溶解して測定用試料を調製し、測定用試料の凝集度合を検出することを特徴とする。

【0007】

【発明の実施の形態】

本発明の全血免疫測定法における不溶性担体粒子のサイズは、粒子凝集法で 사용되는従来公知のものが使用できる。0.1～20 $\mu$ m、さらには0.1～1.0 $\mu$ mが好適である。

【0008】

また、不溶性担体粒子は、粒径の均一な粒子が好適であり、合成高分子とくにポリスチレンラテックスが好ましい。

【0009】

赤血球溶解剤としては、単に赤血球膜を破壊するだけでなく、膜を溶解、あるいは収縮できるものが使用される。具体的には、水溶性界面活性剤が好適である。水溶性界面活性剤は、カチオン性、アニオン性、非イオン性、両性のいずれでも構わない。水溶性界面活性剤のうち、疎水性部分の疎水性の強いもの（炭素数の多いもの）ほど赤血球を溶解する力が強くなるので好ましい。カチオン性界面活性剤の例としては、アルキルトリメチルアンモニウム塩、アルキルピリジニウム塩が挙げられる。また非イオン性界面活性剤の例としては、ポリオキシエチレンアルキル（またはアルケニル）エーテル、ポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテルが挙げられる。アニオン性界面活性剤の例としては、アルキル硫酸塩が挙げられる。両性界面活性剤の例としてはアルキル酢酸ベタインが挙げられる。血球計数の分野において、赤血球を溶血するために用いられる界面活性剤が好適に用いられる。

## 【 0 0 1 0 】

また、凝集反応混合物を希釈するために用いる水溶液には、赤血球溶解剤の他に塩化ナトリウムのような塩類や緩衝剤を含有させることもできる。

## 【 0 0 1 1 】

検出装置は、粒子凝集を検出できるものならとくに制限されない。免疫比濁法で測定を行う場合には、分光光度計を使用することができる。

## 【 0 0 1 2 】

また、カウンティングイムノアッセイで測定を行う場合は、フローサイトメトリの原理を利用したものが使用でき、市販のフローサイトメータを使用することができる。なお、シスメックス株式会社のPAMIAシリーズは、カウンティングイムノアッセイ用の測定装置であり、最も好適である。

## 【 0 0 1 3 】

本発明の方法の実施に際しては、まず、抗凝固処理された全血を緩衝液を用いて希釈する。抗凝固処理に使用する抗凝固剤は、EDTA塩やクエン酸塩等血液検査で通常使用されるものが使用される。

## 【 0 0 1 4 】

また、緩衝液は、pH 6～8.5の緩衝液などが好適に使用される。さらに、緩

衝液には、非特異反応を抑制するための物質や、増感剤なども必要に応じて添加することができる。全血をあらかじめ緩衝液と混合することによって、後に続くラテックス懸濁液との反応の環境を整えることができる。

【 0 0 1 5 】

希釈倍率は、5～100倍、好ましくは10～50倍が好適である。なお、試料と緩衝液の混合温度は、20～50℃、混合時間は1～5分で行うことができる。

【 0 0 1 6 】

次に、希釈した血液試料にラテックス懸濁液を添加し、抗原抗体反応を行わせる。反応温度は20～50℃、反応時間は15秒～20分で好適に実施できる。所定時間反応させた後、赤血球溶解剤を含む水溶液で希釈することにより赤血球を溶解し、カウントに適切な粒子濃度に調整して測定用試料を調製し、測定用試料の凝集度（P/T）を測定する。

【 0 0 1 7 】

測定は次のようにして行うことができる。フローセルの中に形成されたシース液の層流中に、測定用試料を少しずつ押し出すと、粒子は一列になって、ひとつずつフローセルの中央を通過する。

【 0 0 1 8 】

フローセルを通過する粒子に対し、フローセルに垂直な方向からレーザダイオードでレーザ光を照射する。レーザ光はフローセルを通過した後、透過光はビームストッパで止められ、前方散乱光のみがフォトダイオードで受光される。なお、散乱光の検出は、前記の前方散乱光以外に側方散乱光を検出することで行ってもよい。

【 0 0 1 9 】

粒子がレーザ光を横切るとき、粒子の体積に応じた強さの散乱光パルスが発生し、フォトダイオードで受光されて、電気パルスとなる。この電気パルスはレーザ光の中に入った粒子が、凝集せず1個のとき、凝集して2個のとき、あるいは凝集して3個のとき、などその体積（容積）に応じた強さとなる。

【 0 0 2 0 】

この電気パルスをその強さで弁別しカウントする。凝集していない単独の粒子



のカウント数をM、粒子が2個以上凝集したもののカウント数をP、MとPの和をTとする。カウントされた全ての粒子のうち、凝集した粒子の割合、すなわち  $P/T$  を凝集度とする。なお、試料と緩衝液との混合から凝集度の算出までの一連の操作は、免疫凝集測定装置PAMIAシリーズ（シスメックス株式会社）で全自動で行うことができる。

#### 【0021】

なお、分光光度計で測定を行う場合には、全血、緩衝液、ラテックス試薬を混合後直ちに赤血球溶解剤を含む水溶液で希釈して溶血させ、溶血させた試料を測定セルに入れ、光を照射して吸光度を測定する。波長は600～2000nmの範囲が好適である。このときの吸光度を時間0（すなわち抗原抗体反応が未反応）の吸光度とする。次いで、全血、緩衝液、ラテックス試薬を混合して所定時間反応させた後、赤血球溶解剤を含む水溶液で希釈して溶血させ、溶血させた試料を同様に測定し、得られた吸光度と時間0の吸光度との差から凝集度合を求めることができる。

#### 【0022】

本発明では、免疫凝集反応を行った後、測定の障害にならないように赤血球を溶解した後に測定を行う。特開平10-48214号のように赤血球を溶血した後に抗原抗体反応を行う方法では、赤血球を溶血するためには多量の界面活性剤が必要になる。多量の界面活性剤の共存下では、抗原抗体反応が阻害されてしまう。使用する界面活性剤濃度を下げるには、全血試料の量を低くするか希釈する必要があるが、そうすると、抗原抗体反応に関与する抗原（または抗体）濃度も低下し、結果として感度が低くなってしまう。しかし、抗原抗体反応後に溶血を行えば、抗原抗体反応自体は界面活性剤の影響を受けない。さらに、抗原抗体反応を先に行わせることによって必要十分な反応を行わせることができ、さらに全血試料が抗原抗体反応に用いられる試薬によって希釈されるために、溶血に必要な界面活性剤濃度を低くすることができる。また、反応した抗原抗体反応複合体（凝集反応物）を崩すことなく検出が可能になる。

#### 【0023】

#### 【実施例】

ランリームHBsAg（シスメックス（株））を用い、全血を溶血後ラテックス凝集反応を行わせた試料と、全血をラテックス凝集反応させた後溶血した試料を調製し、PAMIA-30（シスメックス（株））を用いて測定した。

【 0 0 2 4 】

ランリームHBsAgはHBs抗原測定用の試薬キットであり、ラテックス試薬・緩衝液・検体希釈液・キャリブレーションから構成される。このうち、本実施例では、ラテックス試薬と緩衝液を使用した。

【 0 0 2 5 】

ラテックス試薬は、抗HBs抗体を感作した $0.8\mu\text{m}$ のポリスチレンラテックスの10%(w/v)懸濁液である。

【 0 0 2 6 】

全血 $10\mu\text{l}$ を緩衝液（pH6） $80\mu\text{l}$ と混合し、1分間 $45^{\circ}\text{C}$ でインキュベーションした。これに抗HBs抗体感作ラテックス試薬 $10\mu\text{l}$ 加えて $45^{\circ}\text{C}$ で反応を開始した。

【 0 0 2 7 】

反応を開始してから約20秒後に、 $19\mu\text{l}$ の反応混合物を $950\mu\text{l}$ のシース液（200ppmドデシル硫酸ナトリウム、0.3g/l塩化ナトリウム水溶液）を加えて51倍に希釈し、赤血球を溶血し測定用試料を調製した。測定用試料を、PAMIA-30の光学検出部に導き凝集度 $P/T$ （%）（ $T_1$ ）を測定した。

【 0 0 2 8 】

反応を開始してから約15分後に、凝集度 $P/T$ （%）（ $T_1$ ）の測定と同様に赤血球を溶血した後、凝集度 $P/T$ （%）（ $T_2$ ）を測定した。なお、 $T_1$ は反応初期の凝集度であり、試料が測定範囲内にあるかどうか確認する際に利用されるもので、通常は $T_2$ を試料の凝集度（凝集率）として採用する。

【 0 0 2 9 】

一方、比較のために従来法として、溶血させた後にラテックス凝集反応を行わせ、凝集率を測定した。このときは、上記において、緩衝液に、赤血球溶血に必要なドデシル硫酸ナトリウム量として10000ppm添加した。また、測定用試料の調製に使用するシース液にはドデシル硫酸ナトリウムを含まないものを用いた。

## 【 0 0 3 0 】

さらに参考のために血清サンプルを用い、緩衝液及びシース液にはドデシル硫酸ナトリウムを含有させずに凝集率（P／T）を測定した。以下に結果を示す。

## 【 0 0 3 1 】

【表 1】

	血清	本発明	従来法
P/T(%)	46.03	45.38	6.00

## 【 0 0 3 2 】

上記に示したように、従来法では、界面活性剤の影響を受けて抗原抗体反応が阻害されているのに対し、本発明では、阻害されずに測定できていることが確認された。

## 【 0 0 3 3 】

## 【発明の効果】

本発明によれば、測定直前に界面活性剤を含む水溶液で希釈して赤血球を溶解するようにしたことにより、界面活性剤により反応を阻害されることなく抗原抗体反応を行わせることができ、感度の高い測定を行うことができる。

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 全血免疫測定法において、抗原抗体反応に影響を及ぼさずに、血球の影響を除去する方法を提供する。

【解決手段】 全血試料と、抗原（または抗体）を感作した不溶性担体粒子とを混合して免疫凝集反応を行わせ所定時間経過後、得られた凝集反応混合物を、赤血球溶解剤を含む水溶液で希釈することにより赤血球を溶解して測定用試料を調製し、測定用試料の凝集度合を検出する。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [390014960]

1. 変更年月日 1998年10月 7日  
[変更理由] 名称変更  
住 所 神戸市中央区脇浜海岸通1丁目5番1号  
氏 名 シスメックス株式会社